



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

DAYANE PRADO MEDEIROS

**CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO DO
MULTIEPÍTOPO ZIKA VÍRUS COM O SISTEMA BACULOVÍRUS
PARA FINS DE DIAGNOSE SOROLÓGICA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado em forma de artigo como
requisito a graduação em Biomedicina
no UniCEUB sob a orientação da
Professora Doutora: Anabele
Azevedo Lima.

**BRASÍLIA
2017**

AGRADECIMENTOS

Agradecer sempre pelas coisas pequenas é uma escolha inteligente, feita por um coração saudável.

Agradeço ao criador das estrelas, que preferiu morrer por mim, a viver sem mim. A mão que sustenta o universo recebeu o prego de um soldado, á Ele, devo todo o meu respirar.

Aos meus pais, irmão, e avó Glória que mesmo com todas as diferenças sempre me amaram e zelaram por minha educação. Obrigada por me ensinarem a amar os livros, que são as janelas para o mundo. Aos meus tios, tias, primos, avó e avô. Obrigada por serem verdadeiramente minha família.

Ao Professor Doutor Tatsuya Nagata, por me acolher tão bem e sempre estar disposto a me ensinar um pouco mais. Sem seus ensinamentos nada disso seria possível.

Aos meus colegas de trabalho, em especial a Raquel Sampaio, Leonardo Lopes, Nataly Moriya e Layssa Miranda; sem sombra de dúvidas vocês me tornam uma pessoa e uma profissional melhor. Obrigada pelas risadas, bagunças e pelas técnicas ensinadas.

A minha querida orientadora, Anabele, que com muito carinho me acolheu desde o segundo semestre. Obrigada por sua paciência e generosidade.

Aos meus amigos, especialmente a Anna Beatriz, Tiago Venâncio e Vanessa Santos que sempre estão ao meu lado, não importando a distância ou circunstância. Obrigada por sempre acreditarem em mim! Amo vocês!

Ao Olímpio, meu namorado, a quem eu tenho a sorte de chamar de “amor”. “Valeu aí parça”. Obrigada por me ensinar a amar e entender que “o amor tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor nunca falha...” 1 Co 13:7.

Dedico este trabalho a memória de Adilson Baptista Barboza, meu avô, que me ensinou como se recuperar de situações de crise e aprender com elas, ter uma mente flexível e entender que o amor se encontra nos pequenos detalhes. Aquele que deixou saudade, que vem sem se convidar, que vem sem pedir licença. Sei que mesmo aí de cima você está ao meu lado, espero te encher de orgulho.

CONSTRUÇÃO E EXPRESSÃO DO ANTÍGENO DO MULTIEPÍTOPO ZIKA VÍRUS COM O SISTEMA BACULOVÍRUS PARA FINS DE DIAGNOSE SOROLÓGICA

Dayane Prado Medeiros ¹

Anabele Azevedo Lima ²

RESUMO:

A infecção pelo vírus Zika (ZIKV) tem atingido cada vez mais pessoas sendo considerada um problema de saúde pública global devido a sua capacidade de gerar sequelas irreversíveis. O diagnóstico da Zika é feito por RT-PCR, RT-qPCR ou métodos de teste sorológico, que denota problemas de especificidade pois são inviabilizados devido a reações cruzadas com outros Flavivírus. O Baculovírus é mundialmente utilizado como vetor de expressão de proteínas heterólogas. Esse trabalho construiu um Baculovírus recombinante contendo um gene sintético multiepítipo do ZIKV, utilizando-se da proteína E do ZIKV, que é a primeira a ser reconhecida por anticorpos antigênicos, com o objetivo de desenvolver um teste sorológico altamente específico para o Zika.

PALAVRAS-CHAVES: Zika; Diagnóstico; Baculovírus; Proteínas-recombinantes; ELISA.

ABSTRACT:

Zika virus (ZIKV) infection has increasingly reached people as a global public health problem because of its ability to generate irreversible sequelae. The diagnosis of Zika is made by RT-PCR, RT-qPCR or serological test methods, which denote specificity problems because they are not feasible due to cross-reactions with other Flaviviruses. Baculovirus is widely used as an expression vector of heterologous proteins. This work constructed a recombinant Baculovirus containing a ZIKV synthetic multiepitope gene using the ZIKV E protein, which is the first to be recognized by antigenic antibodies, with the objective of developing a highly specific serological test for Zika.

KEYWORDS: Zika; Diagnosis; Baculovirus; Recombinant – protein; ELISA

¹ Aluna de graduação do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Email: dayanepira@gmail.com

² Professora do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB. Doutora em Biologia Molecular e Mestre em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília – UNB.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Cao Lormeau et al. (2014), o Zika vírus (ZIKV) é responsável por transmitir uma das principais doenças virais, a Zika. Transmitidos por artrópodes, são caracterizados por serem arbovírus humano, presentes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo.

O ministério da Saúde (MS) declarou que no ano de 2016 cerca de 271.000 casos foram diagnosticados, contendo assim uma grande importância para a saúde pública. Foram relatados também, que até o mês de julho de 2016, 40 países e territórios confirmaram a ocorrência na região das Américas. Além disso, seis países nas Américas notificaram casos de transmissão sexual do ZIKV (Argentina, Canadá, Chile, Peru, Estados Unidos da América e Brasil).

De acordo com Dick et al. (1952), o ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, pela fundação Rockefeller, na floresta Zika, localizada na Uganda, país Africano. A fundação tinha como propósito inicial, estudar o ciclo enzoótico, relacionado ao animal portador, do vírus da Febre Amarela (YFV), considerado o causador de vários surtos e altas taxas de mortalidade nos países das Américas, África e Europa.

Macnamara (1954), afirmou que, a primeira infecção por ZIKV em humanos foi descrita em 1954 na Nigéria, sendo dois casos baseados em soro conversão, ou seja, presença de anticorpos em quantidades suficientes para a detecção, e em isolamento viral no soro. Marchette (1969), afirmou que as primeiras detecções diretas do vírus, utilizando técnicas moleculares, foram feitas na Ásia, assim como, os primeiros sinais de transmissão por um vetor urbano (mosquitos *Aedes aegypti*), coletados na Malásia no ano de 1966.

O centro de controle e prevenção de doenças (CDC, 2017), no Estados Unidos da América, descreveu a variabilidade das vias de transmissão, sendo a principal, através da picada dos mosquitos do gênero *Aedes* e a principal espécie, sendo o *Aedes aegypti*. Após contraírem o vírus, este demora cerca de dez dias para completar o ciclo extrínseco. Logo após este período os mosquitos estão capacitados para transmitir a doença. As outras possíveis vias de transmissão do vírus são: vertical (de mãe para filho, durante a gestação e/ou durante o momento do parto), através da relação sexual, pelo ato de transfusão sanguínea ou através da exposição aos ambientes laboratoriais e de cuidados de saúde sem o uso de aparatos e regras de biossegurança.

Segundo Buathong (2015), o ZIKV pertence à família Flaviridae, gênero *Flavivirus*, sendo um arbovírus humano (transmitido por mosquitos), assim como os vírus da Dengue (DENV), o vírus da Febre Amarela (YFV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV). Seu genoma viral é composto por ácido ribonucleicos (RNA) com aproximadamente 11 mil pares de base, de cadeia simples e polaridade positiva, de forma icosaédrica, com diâmetro de aproximadamente 50 nanômetros (nm) e envelopado. De acordo com Ellison (2016), como o DENV, o ZIKV codifica três proteínas de caráter estrutural (C, prM / M e E, com domínios I-III) e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

Pesquisas feitas por Sirohi et al. (2016), usando microscopia Cryo-EM, mostraram a estrutura do ZIKV maduro contendo cerca de 380 aminoácidos. Embora o ZIKV contenha partes estruturais semelhantes a outros Flavivírus, dez aminoácidos distintos que rodeiam o ZIKV no local de glicosilação na sua proteína E foi apresentado como um local próprio e específico de glicosilação em resíduos de Asparagina154, gerando a hipótese de que tal estrutura pode contribuir para o tropismo celular de ZIKV.

Smrati Bajpai (2016), afirmou que os mecanismos infecciosos e de replicação do ZIKV é atualmente descrito semelhantemente aos do DENV e o de outros flavivírus. Quando as partículas virais são liberadas no sangue e infectam células-alvo, a região da proteína E, liga-se a receptores específicos na membrana plasmática do hospedeiro e estimulam a endocitose. Um envelope viral dentro da membrana da célula hospedeira forma um endossoma, que é seguido pela liberação da nucleocapsídeos promovendo assim a replicação. Após a o processo de tradução, os vírion brotam da membrana do retículo endoplasmático. Em seguida, no aparelho de Golgi, a clivagem por protease do vírion imaturo produz uma vírion maduro ou ativo. Nesta fase, as partículas de vírus maduras são libertadas por exocitose podendo infectar outras células.

De acordo com o Ministério da saúde (MS), cerca de 80% das pessoas infectadas pelo vírus não chegam a desenvolver manifestações clínicas. Em casos onde existem a presença dos sintomas, estes incluem: dores de cabeça, febre baixa, mal-estar, dores nas articulações, conjuntivite, coceira e exantema maculopapular e que no geral desaparecem sem a necessidade de tratamento após 3 a 7 dias.

Um estudo realizado por Calvet (2016), confirmou a capacidade do ZIKV em atravessar a barreira placentária, afetando assim o feto. Martines (2016), investigou a patologia do ZIKV e obteve como resultado a detecção do antígeno viral em células da glia e células neuronais, associando assim, a microcalcificação nos três casos. Yockey

(2016), ao realizar pesquisas com ratos do sexo feminino, descobriu que a região genital é susceptível à infecção por ZIKV, levando assim à restrição do crescimento fetal, infecção fetal do cérebro e aborto.

Segundo Mysorekar (2016), a correlação existente entre ZIKV com as patologias de microcefalia em fetos e a síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos humanos, sugerem a presença de tropismo do vírus por células do sistema nervoso, afetando assim o processo de neurogênese fetal e/ou de degeneração de Walleriana (degeneração das fibras nervosas) em adultos. Além disso, Mansuy (2016) descreveu a apresentação da detecção de RNA do vírus no sêmen de um paciente infectado, dentro de 93 dias após o início da infecção por ZIKV. Jouannic (2016) também relatou uma doença de desmielinização que está temporariamente associada as infecções por ZIKV

Segundo informações geradas por Brasil (2017), ainda não existe no mercado científico um tratamento específico. O que se tem nos atuais dias é um tratamento recomendado para os casos sintomáticos, baseados no uso de analgésicos para o controle da febre e dores e em caso de erupções pruriginosas, os fármacos anti-histamínicos podem ser considerados. Não se recomenda o uso de ácido acetilsalicílico (AAS) e outros anti-inflamatórios, em função do risco aumentado de complicações hemorrágicas descritas nas infecções por outros Flavivírus como o DENV.

Embora não haja vacina ou quaisquer terapias específicas para o tratamento de infecções por ZIKV, Barrows (2016), encontrou mais de 20 compostos que inibiram infecção por ZIKV. Suas descobertas podem servir como uma plataforma para desenvolver um fármaco anti-Flavivírus..

Segundo Reis et al. (2009), a tecnologia do DNA recombinante aborda a manipulação do DNA, isolando uma sequência de nucleotídeos que tem capacidade de determinar e/ou influenciar uma característica específica desejada em um organismo, e adentra-lo em um sistema de expressão biológico capaz de produzir a proteína de interesse, expondo uma maior facilidade de expressão de tal. Os produtos pioneiros obtidos a partir de proteínas recombinantes apresentaram como objetivo relocar as formas terapêuticas que já eram realizadas com proteínas em seu modo original, como a insulina resultada da maceração do pâncreas de porcos; ou o hormônio do crescimento, obtido da glândula pituitária de cadáveres, tais processos apresentavam grandes riscos de manipulação e limitação na quantidade obtida.

Inceoglu (2001), verificou que, os Baculovírus são vírus em forma de bastão e envelopados, capazes de infectarem animais da Classe Insecta. Estes pertencem à família

Baculoviridae com genoma de DNA dupla-fita, circular e com tamanho entre 80 e 180 kpb. De acordo com Kost (2005), os baculovírus são utilizados no controle biológico de pragas dos agrossistemas e segundo Hitchman(2011), mundialmente utilizados como vetor de expressão de proteínas heterólogas e avançando em pesquisas para o uso como terapia gênica.

Para Rohrmann (2011), a expressão de proteínas heterólogas usando baculovírus refere-se na inserção de genes de interesse, de outros organismos ou do próprio genoma do vírus na região de um gene não-essencial para que a replicação viral aconteça. Após a modificação do vírus e a inserção do fragmento de DNA de interesse é gerado um vírus com a capacidade de se replicar em células de inseto.

Yu-Chen (2005) explicou que a utilização do Baculovírus como sistema de expressão de proteínas heterólogas possuem algumas vantagens, dentre elas a habilidade de realizar modificações pós-traducionais adequadas; a capacidade de inserir grandes insertos ou múltiplos genes, devido ao grande genoma viral; a biossegurança do manuseio das células e da utilização da proteína produzida, já que Baculovírus não são capazes de infectar células humanas e um alto rendimento de proteína produzida devido à utilização de promotores fortes.

Zheng (2004), afirmou que a utilização do Baculovírus com sistema de expressão habilitou o uso de Baculovírus na expressão de antígenos virais com finalidade vacinal e de diagnóstico, tanto humano, quanto veterinário. Um exemplo de utilização do sistema é a vacina para HPV (*human papillomavirus*), a Cervarix, sendo comercializadas a nível mundial.

De acordo com Ardisson Araújo (2012), existem também pesquisas aplicadas na área biotecnológica utilizando tal sistema para a produção de kits de diagnóstico através da expressão de proteínas recombinantes com interesse médico, um exemplo são os capsídeos virais das proteínas VPX e VP3 do birnavírus causador da doença da bursite infecciosa e VP1 e VP2 do Parvovírus humano B19 que foram expressos para produção de kit de diagnóstico sorológico por ELISA.

Segundo o CDC (2017), atualmente o diagnóstico da Zika é feito por RT-PCR (transcrição reversa-reação de polimerase em cadeia) ou RT-qPCR (RT-PCR quantitativa ou tempo-real), sendo um protocolo oneroso e trabalhoso. No mercado farmacêutico existe também o método de teste sorológico para Zika, que denota problemas de especificidade pois são inviabilizados devido a reações cruzadas com outros Flavivírus, tais como os DENV e Encefalite Japonesa. Outro ponto crucial na apresentação de

reações cruzadas origina-se da vacinação em massa no Brasil contra Febre Amarela, no qual anticorpos reagem com epítomos conservados dos Flavivírus. Destarte, ainda se existe a necessidade de desenvolvimento de um teste utilizando-se de um complexo estratégico de características específicas e de alta fidelidade para a diagnose da doença.

Mansfield (2011), afirmou que por conta da reatividade cruzada entre os Flavivirus, causadas pelos sítios antigênicos com similaridade intensa, testes sorológicos de detecção de anticorpos IgM possuem uma atividade de diferenciação entre as infecções virais causada pelo ZIKV e os outros pertencentes ao gênero Flavivírus não confiável. Tal característica representa que os anticorpos contra o ZIKV podem reagir com anticorpos de outros Flavivírus indicando um resultado falso positivo. Em consequência a esses fatos, os testes sorológicos (ELISA) de detecção de IgM para ZIKV na verdade são considerados um indicativo de infecção recente por Flavivírus.

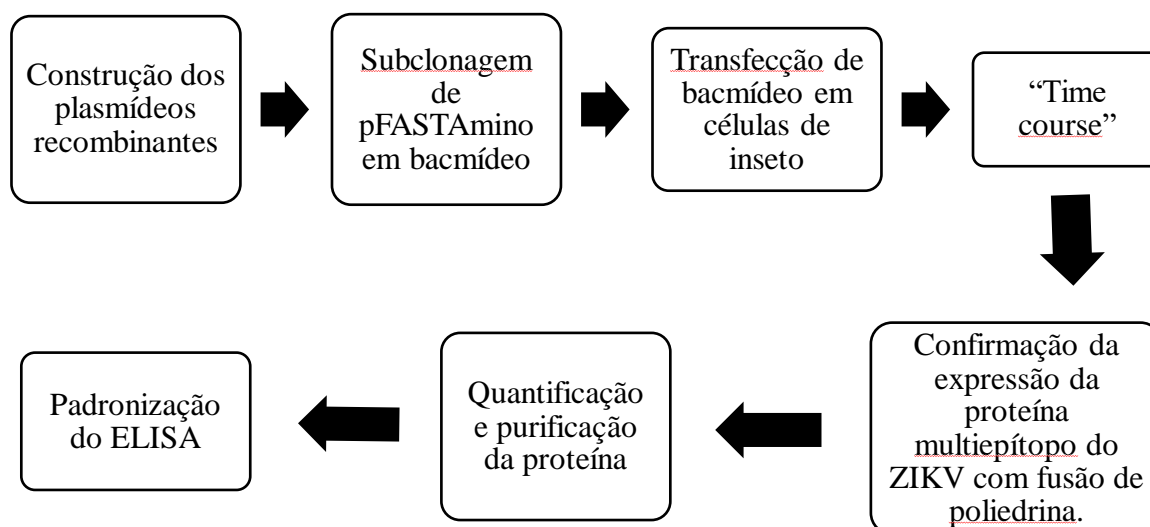
Estudos feitos também por Mansfield (2011), afirma que pacientes que receberam a vacina da febre amarela (que ocorre em massa no Brasil) ou que foram infectados por outro Flavivírus no passado, tem maior chance de apresentarem reação cruzada, o que dificulta a identificação específica ao vírus causador da infecção.

Nesse contexto, o presente trabalho visou a construção de um baculovírus recombinante contendo um gene heterólogo e sintético multiepítopo do ZIKV, com alta afinidade para Zika vírus, com a perspectiva de futuramente utilizar-se para a produção de um teste sorológico pelo método ELISA, altamente específico para infecções causadas pelo Zika vírus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido e elaborado na Universidade de Brasília (UnB), no laboratório de Virologia e Biologia Molecular; sendo coordenado pelo Professor PhD Tatsuya Nagata. A orientação foi feita pela professora Anabele Azevedo Lima. O financiamento e colaboração foi feita pelo próprio laboratório em questão; pela Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF); a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); a empresa Sabin e Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF). As etapas utilizadas, podem ser observadas no esquema (Quadro 1).

Quadro 1: Descrição das etapas utilizadas.



Fonte: Acervo da autora. (2017).

2.1 Construção dos plasmídeos recombinantes

Os epítomos do ZIKV foram escolhidos através da análise do sequenciamento do gene completo do vírus e mapeamento de seus epítomos. Estes epítomos foram mapeados por anticorpos monoclonais específicos ao ZIKV que reconhecem a sequência primária de aminoácidos e a estrutura do domínio I-III da proteína E do ZIKV. Três epítomos foram selecionados e ligados a um "linker" de tetraciclina entre os epítomos.

O DNA correspondente a esta sequência foi sintetizado pela empresa Epoch Life Science (Sugar Land, TX, EUA) com otimização de códon e eliminação de íntron críptico.

O gene foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos; Forward 5' GGATCCATGGAAATGAAGACTAAC 3' e Reverse 5' GGATCCATGGCCAACCTCGTCTTTA 3'; específicos para amplificação dos fragmentos desenhados, os mesmos foram produzidos pela empresa Biomatters Ltda. Os oligonucleotídeos em questão possuem sítios referentes a enzima de restrição *NcoI*. Amino-terminal da poliedrina. Tal reação foi desenvolvida conforme o Quadro 2, demonstrada logo abaixo.

Quadro 2: Descrição da reação utilizada para a amplificação do fragmento de interesse.

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação primária	95°C	2 minutos
Desnaturação	95°C	20 segundos
Anelamento	52° C	30 segundos
Extensão primária	72° C	1 minuto
Extensão	72 ° C	5 minutos

Fonte: Acervo da autora (2017).

O gene amplificado foi clonado no sítio de clonagem *NcoI*, no vetor de Baculovírus pFASTAmino, modificado do plasmídeo pFASTBac1 (comercial), que tem como propriedade a inserção do gene de poliedrina.

Para o sucesso dessa clonagem, o DNA do gene amplificado, foi submetido à uma reação de ligação ao plasmídeo desejado, com o auxílio da enzima *T4 DNA ligase*, ambos previamente digeridos com *NcoI*. Essa reação foi incubada por um período de 12 horas à 4°C e posteriormente transformada em células em *Escherichia coli* DH10B (Thermo Scientific, MA, EUA), através do sistema de Eletroporação; e semeadas em meio LB sólido contendo apenas o antibiótico de seleção (presentes no plasmídeo), Ampicilina e Gentamicina.

Com este vetor, o peptídeo multiepítipo do ZIKV foi expresso em fusão com proteína poliedrina do baculovírus. A vantagem deste sistema é que a proteína alvo é fusionada com a poliedrina, formando um cristal, que possibilita a purificação de proteína alvo por centrifugação diferencial.

Os plasmídeos foram purificados de *E. coli* e avaliados por eletroforese, a partir do perfil de fragmentos de DNA digerido com *NcoI*. Os plasmídeos selecionados foram sequenciados pelo método Sanger no MacroGen (Seoul, Coreia do Sul) para confirmação da clonagem correta.

Foi realizada a modelagem da proteína, utilizando-se o programa Swiss Model.

2.2 Subclonagem de pFASTAmino em bacmídeo

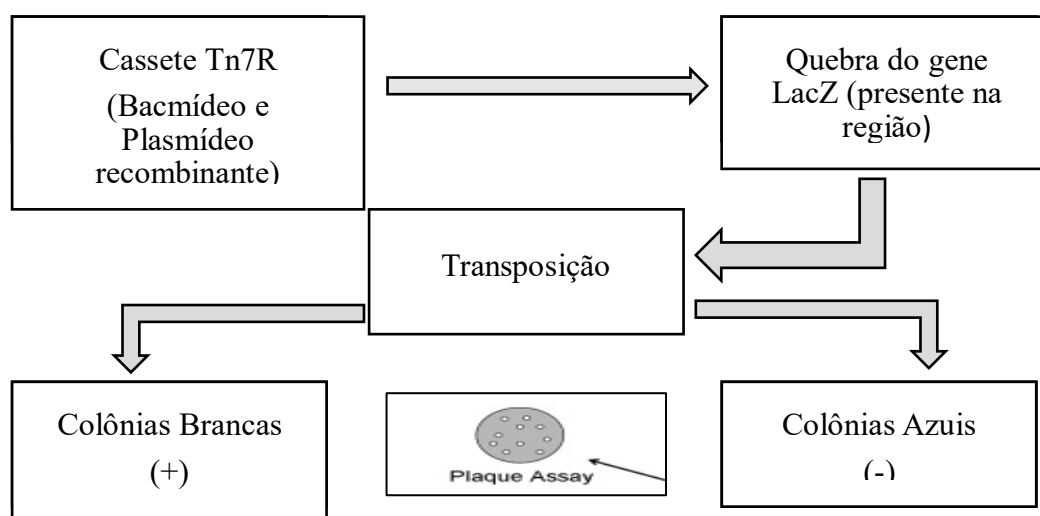
O plasmídeo pFASTAmino com o multiepítipo do Zika Vírus selecionado pelo sequenciamento, foi transfectado em *E. coli* cepa DH10Bac que contém o bacmídeo para ser recombinado com sistema Bac-to-Bac da empresa Thermo Scientific (Invitrogen), representado pelo Quadro 3.

O bacmídeo se caracteriza por ser um plasmídeo gigante que carrega o genoma do baculovírus AcMNPV recombinante mantido como um cromossomo artificial e um plasmídeo helper contendo o transposon Tn7, que possui derivação de um bacteriófago, capaz de unir as regiões entre os sítios de Tn7 e o plasmídeo selecionado ao genoma do Baculovírus AcMNPV recombinante. Este tem capacidade de se propaga em *E. coli*.

A região de transposição apresenta a presença do gene LacZ, que concede a seleção através da coloração apresentada pelas colônias. Colônias onde o gene se mantém presente apresentam cor azul e as colônias onde o gene é cessado pela transposição apresentam cor branca.

O sistema possibilita a recombinação de pFASTAmino e bacmídeo apresentam a cor branca. As bactérias *E. coli* contendo o bacmídeo recombinante, são resistentes à Gentamicina, Canamicina e Tetraciclina e as colônias viáveis em meio seletivo foram selecionadas. A recombinação foi confirmada com "*Orientation-Directed PCR*", com os oligonucleotídeos M13 (Forward e Reverse) e o específico para a sequência do Multiepítipo ZIKV sintetizado. Após a seleção e confirmação dos clones, os bacmídeos foram purificados para serem transfectados em células de inseto.

Quadro 3: Sistema Bac-to-bac para construção dos baculovírus recombinantes.



Fonte: Adaptado de Invitrogen. (2015).

2.3 Transfecção de bacmídeo em células de inseto

Um micrograma do bacmídeo selecionado foi transfectado em células de lepidoptera, *Trichoplusia ni*, de linhagem Tn5B com Cellfectin® II (Thermo Scientific). Após a confirmação da transfecção por meio de análise dos sintomas em células (efeito citopático), os baculovírus recombinantes obtidos e secretados no sobrenadante das células transfectadas foram utilizados na infecção de monocamadas confluentes de células Tn5B (cerca de 10^6 células por placa), as infecções foram mantidas a 27°C por 3 dias. Os sintomas de infecção foram observados 72 horas pós-inoculação (h.p.i).

2.4 “Time course”

Foi realizado o “time course” do vírus recombinante, onde se acompanhou a infecção nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas de infecção, afim de analisar o ciclo de replicação da infecção viral.

2.5 Confirmação da expressão da proteína multiepítopo do ZIKV com fusão de poliedrina.

A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi realizada pela análise extratos de células infectadas pelos vírus recombinantes em gel SDS-PAGE 12% e por *Western blotting*.

A expressão da proteína multiepítopo-poliedrina foi avaliada por *Western blotting* utilizando anticorpo policlonal para poliedrina. A expressão foi confirmada por reatividade em anticorpo para o anticorpo monoclonal His Tag (que contém uma cauda de histidina em sua composição) e mudança da velocidade da migração em eletroforese.

2.6 Quantificação e purificação da proteína

A purificação foi feita através da lavagem com Tampão Fosfato Salino (PBS) 1x, por três vezes; em seguida submetido a cinco lavagens com Cloreto de sódio (NaCl) 5M; e uma lavagem com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%; sendo que a cada lavagem foi-se centrifugado á 20°C, 10 minutos, à 12.000 rpm,

A quantificação das proteínas foi realizada através da técnica de Bradford. Concentrações de Albumina de soro bovino (BSA) de 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/dL; e a amostra contendo a proteína de interesse da análise (devidamente diluída, conforme estabelecido pelo protocolo) passaram pela leitura, utilizando-se o espectrofotômetro DU 800 – Beckman, com a absorbância de 595 nanômetros. O estabelecimento da quantidade

encontrada foi feito através da realização de um gráfico de absorvância no programa EXCEL da MICROSOFT OFFICE.

2.7 Padronização do ELISA

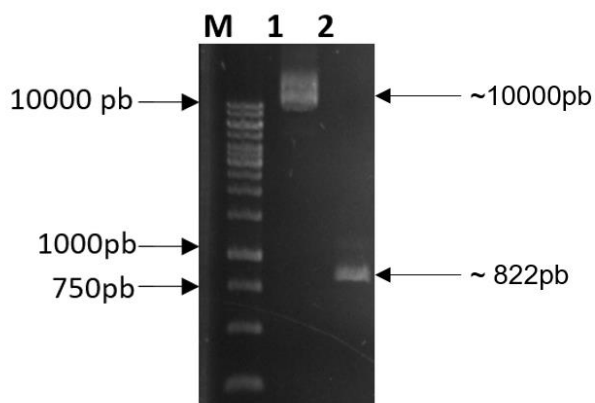
Para este trabalho foi escolhido o método ELISA, que se encontra em teste pelos Laboratório de Flavivírus da FIOCRUZ, no Rio de Janeiro; na sede da empresa Sabin, no Distrito Federal; e no LACEN-DF.

3. RESULTADOS

3.1 Construção dos plasmídeos recombinantes

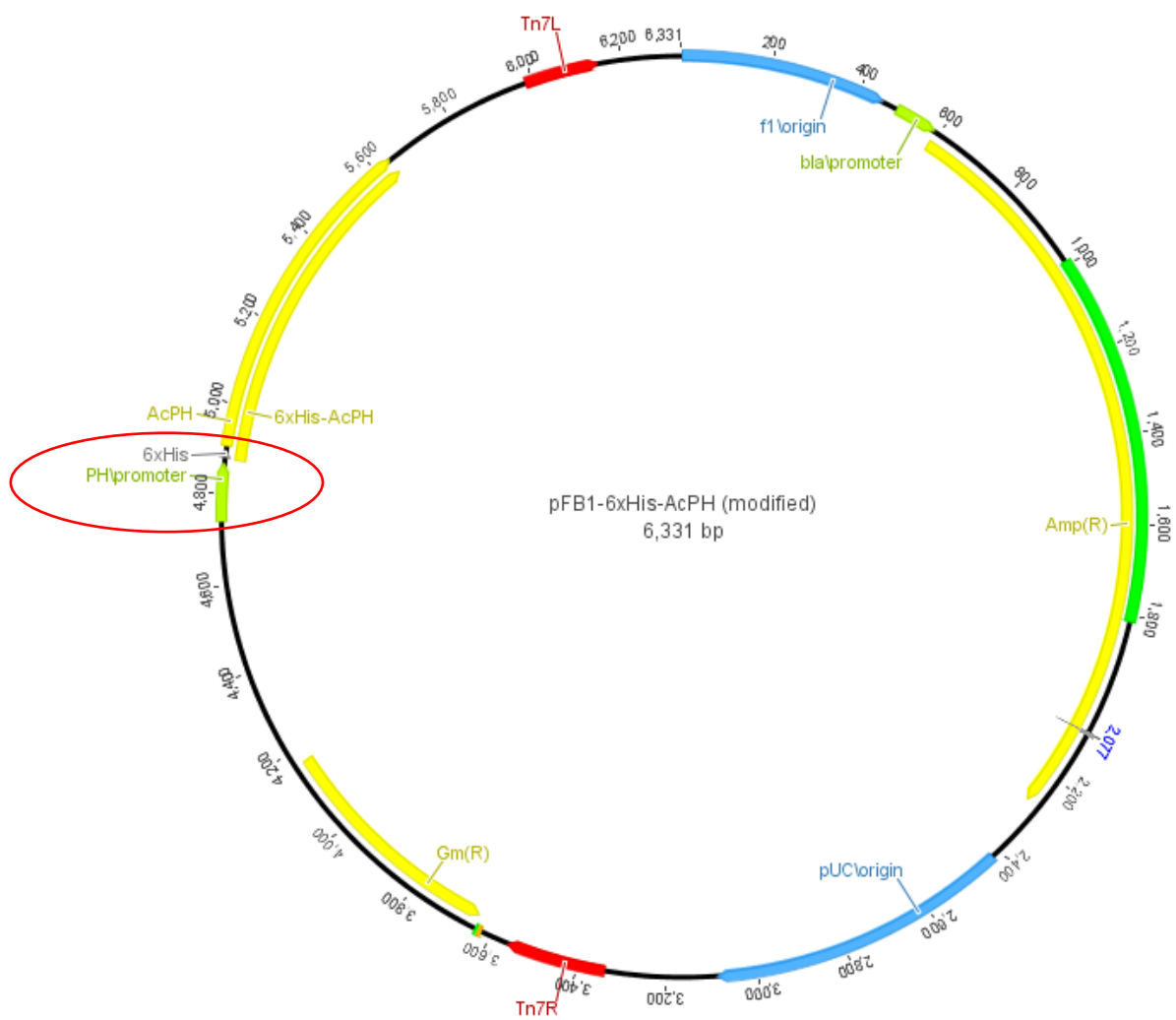
Após os epítomos do ZIKV serem escolhidos pela análise do sequenciamento do gene completo do vírus e mapeamento de seus epítomos, o gene sintético com oligonucleotídeos contendo sítios de clonagem *NcoI* foi amplificado por PCR (Figura 2), utilizando-se a enzima VENT DNA polimerase da empresa New England Biolabs Inc (NEB). O plasmídeo pFASTAmino (Figura 3), foi obtido através da preparação de plasmídeo (Figura 2). Logo em seguida os dois materiais foram digeridos com a enzima *NcoI* (Figura 4).

Figura 2: Eletroforese de Gel de agarose a 1% mostrando DNA do gene do multiepítopo do Zika Vírus amplificado por reação em cadeia da Polimerase, com 822 pb (1) e plasmídeo pFASTAmino (2), confirmando a amplificação do gene e obtenção do plasmídeo recombinante e o marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific, MA, EUA) (M).



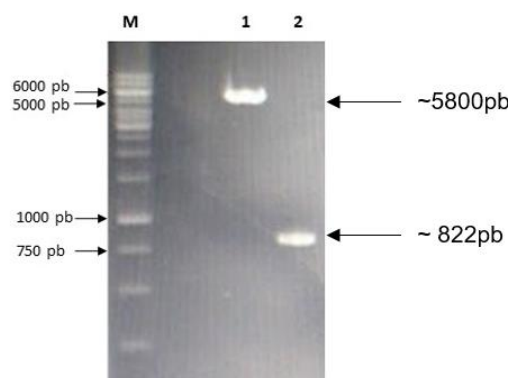
Fonte: Acervo da autora (2017).

Figura 3: Mapa estrutural do plasmídeo PFASTAmino (variação do plasmídeo PfasBac1 gerada através da adição de uma cauda de histidina e sítio de reconhecimento da enzima *NcoI*). A região demarcada em vermelho corresponde ao local de inserção do gene sintético construído nesse trabalho



Fonte: Acervo da autora (2017).

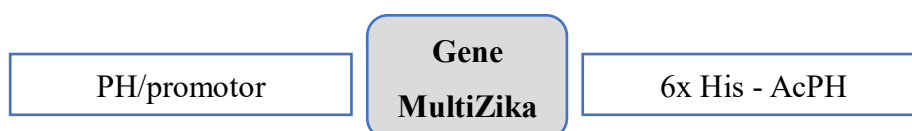
Figura 4: Eletroforese de gel de agarose a 1% mostrando DNA do gene do multiepítopo do Zika Vírus com cerca de 822 pb (1) e plasmídeo pFASTAmino com cerca de 5.800 pb (2) digeridos com as enzimas de restrição *NcoI*, confirmando a obtenção do plasmídeo recombinante e o gene do multiepítopo, e o marcador de peso molecular 1Kb(Thermo Scientific, MA, EUA) (M).



Fonte: Acervo da autora (2017).

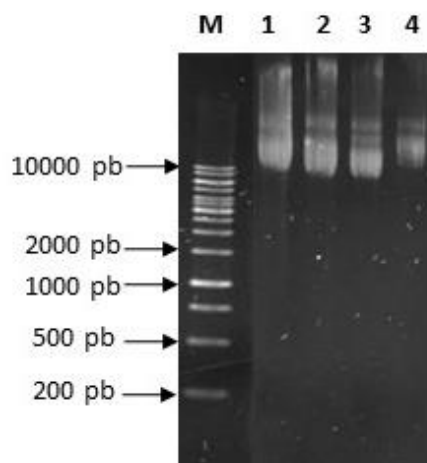
Com os insertos e vetores devidamente preparados, foi realizado a ligação dos mesmos (Figura 5) com a enzima T4 DNA ligase, utilizando-se 4 μ L de DNA e 4 μ L de plasmídeos, incubado “*over night*” à 16°C. Logo em seguida foi feita a clonagem através de transformação em células de *Escherichia coli* DH10B (Thermo Scientific, MA, EUA), por eletroporação e plaqueadas em meio sólido de LB com antibióticos de seleção: gentamicina e ampicilina. Foram selecionadas dez colônias, no qual foram incubadas em meio LB líquido, *over night* à 37°C, passando logo em seguida pela extração de DNA dos clones pelo Kit de preparação de plasmídeos. Dentre as dez colônias selecionadas, quatro foram escolhidas para serem confirmadas com as devidas técnicas correspondentes (Figura 6).

Figura 5: Mapa estrutural do plasmídeo pFASTAmino demonstrando sítio de clonagem, inclusão do inserto recombinante, gene de resistência a antibióticos, promotor e gene que codificam a proteína poliedrina, cauda de histidina e sítios de transposição.



Fonte: Acervo da autora. (2017).

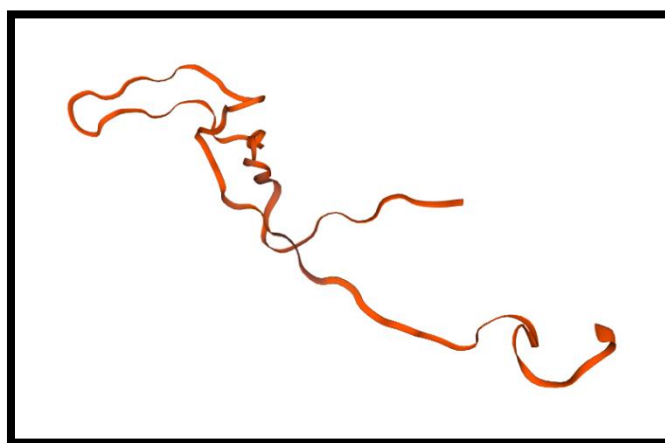
Figura 6: Eletroforese de gel de agarose a 1% mostrando DNA dos clones selecionados, obtidos através do Kit de preparação de plasmídeos, os clones selecionados para prosseguimento foram os presentes na Figura (1; 2; 3; 4), e o marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific, MA, EUA) (M).



Fonte: Acervo da autora. (2017).

Foi realizada a estrutura terciária do multipeptídeo fusionados à poliedrina e a calda de histidina revelou uma estrutura de 273 aminoácidos e 58kDa (Figura 7)

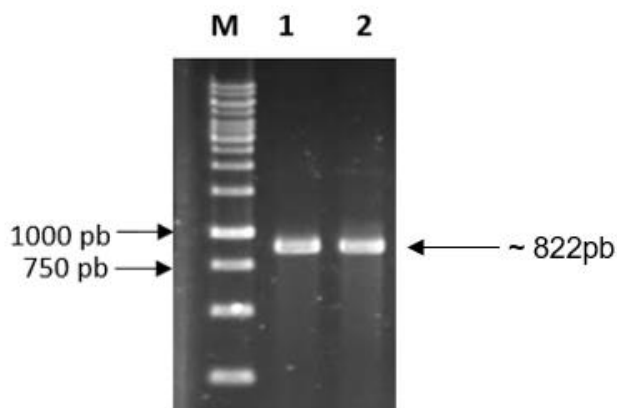
Figura 7: Estrutura terciária da proteína recombinante sintetizada nesse trabalho, obtida pelo programa Swiss-Model.



Fonte: Acervo da autora (2017).

A clonagem foi confirmada por digestão do DNA (Figura 8) dos plasmídeos recombinantes com a enzima de restrição de *NcoI* e por PCR.

Figura 8: Eletroforese de gel de agarose a 1% mostrando DNA da confirmação da clonagem dos plasmídeos por PCR, os clones selecionados para prosseguimento foram os presentes na Figura (1; 2), e o marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific, MA, EUA) (M).



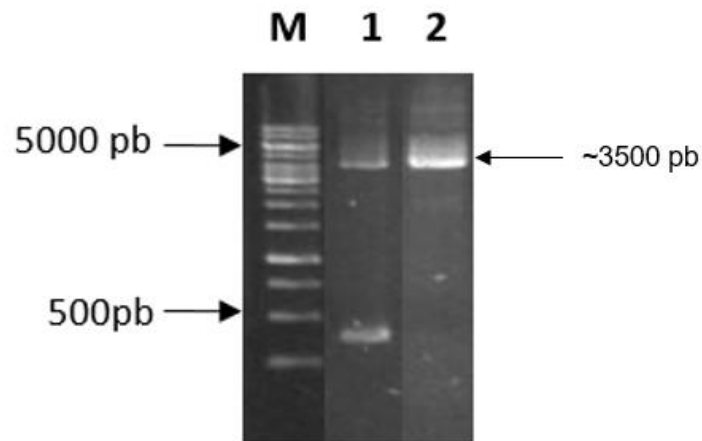
Fonte: Acervo da autora (2017).

Os clones com maior eficiência, que foram confirmados por PCR, foram selecionados e enviados para sequenciamentos pelo método Sanger no Macrogen (Seoul, Coreia do Sul) para confirmar a clonagem correta.

3.2 Subclonagem de pFASTAmino em bacmídeo

Após a análise do sequenciamento o clone com mais eficiência foi selecionado e transfectado em *E. coli* cepa DH10Bac que contém bacmídeo para ser recombinado com sistema Bac-to-Bac da empresa Thermo Scientific. A seleção foi confirmada em "Orientation-Directed PCR" (Figura 9).

Figura 9: Eletroforese de gel de agarose a 1% mostrando DNA da confirmação da clonagem dos bacmídeos por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13 indicados pelo fabricante, liberando fragmentos de aproximadamente 3.460 pb, os clones selecionados para prosseguimento foram os presentes na Figura (1; 2); e o marcador de peso molecular 1Kb (Thermo Scientific, MA, EUA) (M).

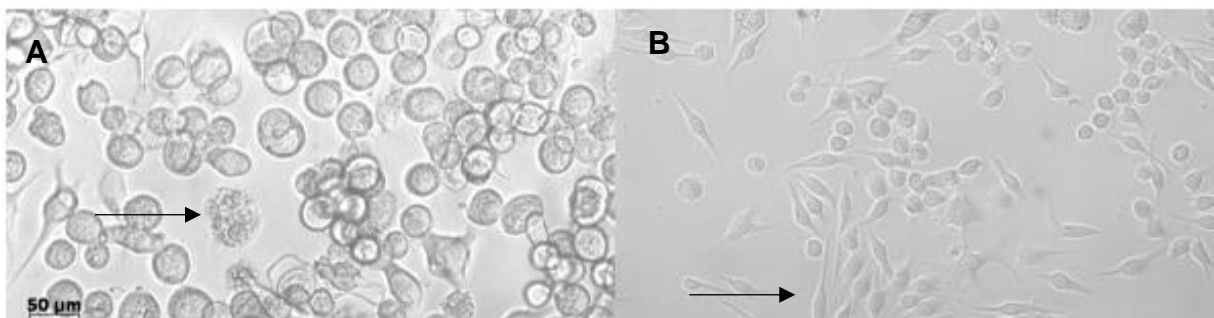


Fonte: Acervo da autora (2017).

3.3 Transfecção de bacmídeo em células de inseto

O bacmídeo selecionado foi transfectado em células de lepidoptera, *Trichoplusia ni*, de linhagem Tn5B com Cellfectin® II (Thermo Scientific) (Figura 10), e confirmados através da análise dos sintomas em células (efeito citopático).

Figura 10: Células de inseto infectadas com o vírus recombinante (A), sendo observado o efeito citopático da célula e células *Trichoplusia ni*, de linhagem Tn5B com Cellfectin® II (Thermo Scientific) mock, não infectadas (B), gerando a possibilidade de observação. As células foram analisadas utilizando microscópio óptico (Axiovert 100, Zeiss) – Barra de referência - 50µm.

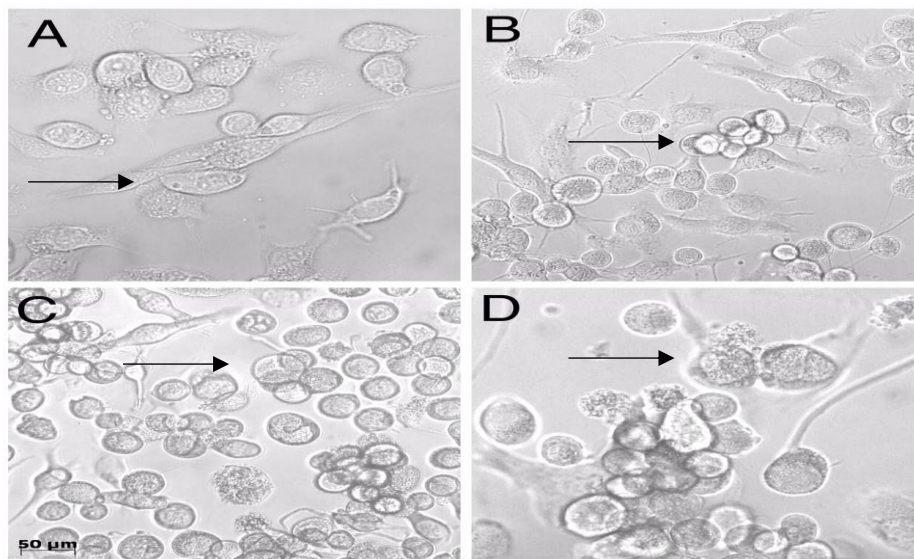


Fonte: Acervo da autora (2017).

3.4 “Time course”

Os vírus foram transfectados em células Tn5B e acompanhados por 96 horas (Figura 11), demonstrando a evolução da infecção pelo vírus, os efeitos citopáticos causados por estes e a produção das proteínas de interesse.

Figura 11: Células de inseto infectadas com o vírus recombinante, sendo observado o efeito citopático, tempo de 24 horas pós-infecção (h.p.i) (A); 48 (h.p.i) (B); 72 (h.p.i) (C); 96 (h.p.i) (D).

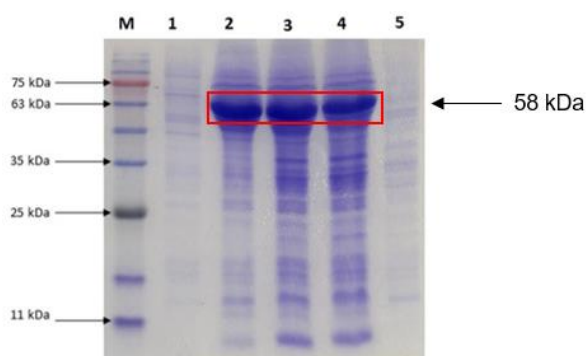


Fonte: Acervo da autora (2017).

3.5 Confirmação de expressão de proteína multiepítopo do ZIKV com fusão de poliedrina

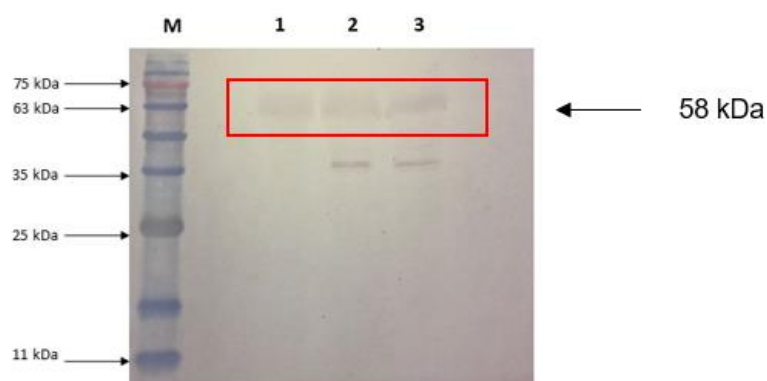
Foi feita a confirmação da expressão (Figura 12 e Figura 13) da proteína através da técnica de “Western Blotting”.

Figura 12: Eletroforese para confirmação da proteína através do gel de SDS-PAGE, indicando as amostras de tempo de 24 horas pós inoculação (h.p.i) (1); 48 (h.p.i) (2); 72 (h.p.i) (3); e o marcador de peso molecular 180KDa (Thermo Scientific, MA, EUA) (M).



Fonte: Acervo da autora (2017).

Figura 13: Western blotting para a confirmação da proteína através da membrana de “Western Blotting”, indicando as amostras de tempo de 24 horas pós inoculação (h.p.i) (1); 48 (h.p.i) (2); 72 (h.p.i) (3); e o marcador de peso molecular 180KDa (Thermo Scientific, MA, EUA) (M).

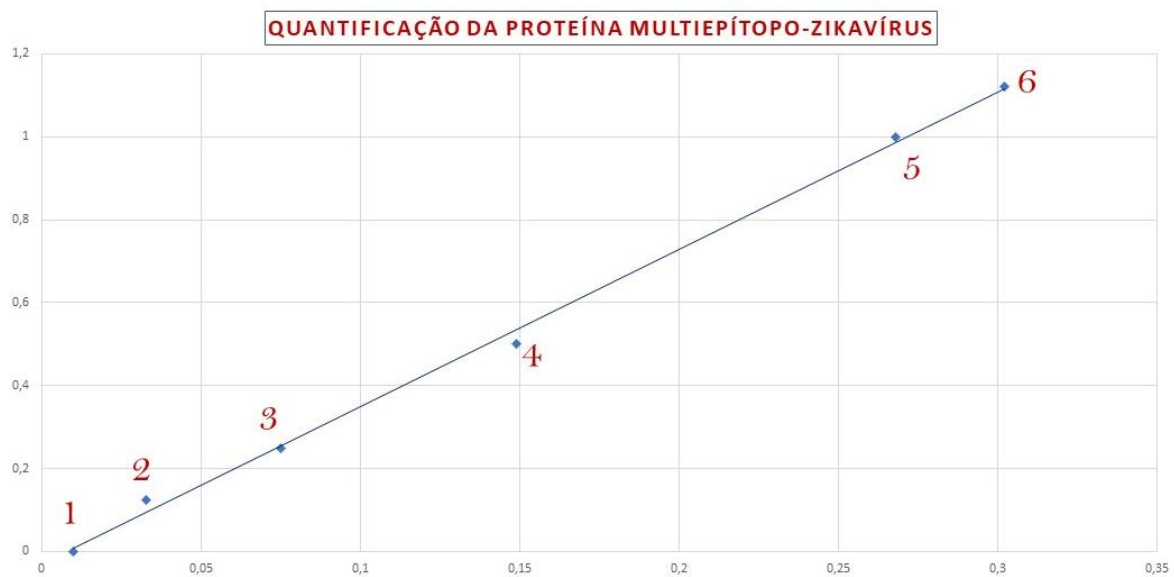


Fonte: Acervo da autora (2017).

3.7 Quantificação e purificação da proteína

A quantificação das proteínas foi feita através da leitura pelo espectrofotômetro (Figura 14), sendo o ponto (1) equivalente a concentração branca (sem amostra); (2) 0.125 mg/mL de BSA; (3) 0.25 mg/mL de BSA; (3) 0.50 mg/mL de BSA; (5) 1.0 mg/mL de BSA; (6) 1.12 mg/mL da amostra do Multiepítipo do ZIKV.

Figura 14: Gráfico de quantificação da proteína do Multiepitopo do Zika vírus



Fonte: Acervo da autora (2017).

3.7 Avaliação do teste diagnóstico

O tipo de ELISA escolhido foi o Indireto para a detecção de IgM nos soros que futuramente serão analisados.

O protocolo já se encontra estabelecido e inclui a sensibilização de uma placa de 96 poços, com a proteína de interesse. Os parâmetros alterados para a padronização do teste realizado foram: quantidade de proteína por poço para a sensibilização da placa (5 µg) e o tempo de bloqueio (alterado para 1 hora).

4. DISCUSSÃO

Bosch (2017), relatou que as infecções causadas pelo ZIKV ganharam atenção global em 2015, quando milhares de casos clínicos apareceram no norte do Brasil, com relatos devastadores de defeitos congênitos, incluindo microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, sendo posteriormente declarado pela Organização Mundial da saúde uma emergência de saúde pública.

O presente trabalho teve como objetivo a construção de uma proteína recombinante baseada em sítios específicos da proteína E do ZIKV, afim de desenvolver um sistema de diagnóstico de infecção por ZIKV.

De acordo com Shrestha (2010), durante as infecções por Flavivírus a proteína E é a primeira a ser reconhecida por anticorpos neutralizantes, essas realizam a ligação aos receptores de superfície celular e penetração na célula, apresentam epítomos em todos os três domínios estruturais (DI; DII; DIII), com uma gama consideravelmente maior anticorpos específicos que reconhecem o DIII. Devido à estudos como esse publicados, foi escolhido a proteína E como base da construção realizada neste trabalho.

Zhang (2016), descreveu que cada domínio apresenta funções particulares. O DI é o domínio central (porção N terminal) que liga DII e DIII juntos. A dobradura DI-DII é altamente flexível, permitindo que a DII exponha seu circuito de fusão durante o evento de penetração na célula. Os anticorpos que reconhecem o circuito de fusão em DII, possui contato com moléculas adjacentes ao longo da superfície (peptídeo de fusão) são mais reativos e neutralizam os flavivírus de forma menos eficiente, embora possam ainda ter atividade protetora in vivo.

De acordo com Dai (2016), o DIII contém o local de ligação ao receptor e desempenha um papel importante na fusão do vírus com a membrana endossomal durante a entrada célula, realizando a ligação ao receptor e alvo de anticorpos neutralizantes (induzindo respostas protetoras), além de ser responsável pelo tropismo e virulência do Flavivírus.

Segundo Rouvinski (2015), os anticorpos anti-flavivírus que neutralizam potentemente também tem capacidade de reconhecer uma nova classe de epítomos complexos compostos por um ou mais domínios da proteína E. Dessa forma, a estratégia descrita pelo autor gera credibilidade e confiança na realização de estudos com tal linha de pensamento, sendo crucial para o desenho do multiepítomo construído neste trabalho, demonstrado na figura 3 e figura 5 onde a fusão do gene de interesse com o vetor escolhido foi demonstrado.

Arantes (2007), discorreu a efetividade do Baculovírus como sistema de expressão, sendo capaz de carregar uma grande quantidade de material genético alheio, gerando uma composição de proteínas expressas sob fatores de promotores, o que leva à possibilidade de substituir os genes que codificam as proteínas não essenciais do vírus por genes que possuem a capacidade de codificar proteínas recombinantes de interesse e, por consequência, como exemplo, utilizar esta estratégia para a produção de testes

diagnóstico. Tal estratégia foi utilizada neste trabalho.

Para Barros (2007), os Baculovírus são vírus de inseto, todavia, são de ampla utilidade em estudos designados para seres humanos por exibirem riscos biológicos quase mínimos. Tal fato ocorre devido a incapacidade dos mesmos de se replicarem em células de mamíferos, acarretando em um vetor de fácil manuseio, grande especificidade, seguro e com altas titulações, como demonstrado na Figura 14, do produto de interesse.

Segundo Ribeiro (2016), o sistema “Bac-to-Bac”, utiliza as propriedades sítio específicas do transposon Tn7 de bactéria para a construção de um bacmídeo recombinante, sendo importante para eficácia da clonagem em bactérias de linhagem *E. coli* DH10bac (nomeada de bacmídeo) que contém o genoma completo do baculovírus AcMNPV na forma de um plasmídeo, evitando contaminação com bactérias que não geraram a transposição do gene recombinante, pois a mesma afetaria na efetividade da expressão da proteína recombinante de interesse.

O bacmídeo contém o replicon mini-F de baixo número de cópias, um gene de resistência à Canamicina e um segmento de DNA que codifica o peptídeo LacZ α . Com o vetor escolhido, a expressão do gene de interesse é controlada pelo promotor do gene polh ou p10 do vírus AcMNPV. Este cassete de expressão é flanqueado por braços mini-Tn7 (Tn7R e Tn7L), e também contém um gene que confere resistência à gentamicina e um sinal de poliadenilação do vírus SV40.

Segundo Invitrogen (2015), o uso da técnica de PCR utilizando-se de oligonucleotídeos M13 garante alta sensibilidade e a identificação de não recombinantes que poderiam estar contaminando a colônia escolhida. Como observado na Figura 9, as bandas de interesse apresentavam por volta de 3500 pares de bases o que confirma a infecção do bacmídeo com o gene de interesse, devido a presença de bandas acima de 2300 pares de bases ser fato confirmatório para transposição do bacmídeo em pFastBac.

Ribeiro (2016), descreveu que proteínas recombinantes carregadas pela poliedrina são capazes de formar corpos de oclusão com características aproximadas às dos cristais selvagens. Esta se encontra presente nos corpos de oclusão dos baculovírus, fazendo com que a região responsável pela sua expressão acarrete em uma ótima estratégia para a adesão de um gene de interesse, responsável por sintetizar uma proteína de relevância desejada. Outros grandes benefícios desse sistema, se dá pelo baixo custo em sua produção e a pureza de alto grau no material coletado. Mediante isso, técnicas semelhantes às usadas para purificação de vírus selvagens podem ser empregadas para

purificação das massas proteicas contendo a proteína recombinante, gerando facilidade na purificação de proteínas recombinantes fusionadas à poliedrina. Nesse trabalho, a expressão da poliedrina foi moderada por um gene promotor polh, gerando a expressão de uma proteína heteróloga de 7kDa. A mesma foi utilizada neste trabalho e representas nas figura 10 figura 11.

Ribeiro (2016), descreveu que proteínas recombinantes carregadas pela poliedrina são capazes de formar corpos de oclusão com características aproximadas às dos cristais selvagens e, mediante isso, técnicas semelhantes às usadas para purificação de vírus selvagens podem ser empregadas para purificação das massas proteicas contendo a proteína recombinante gerando facilidade na purificação de proteínas recombinantes fusionadas a poliedrina. A mesma foi utilizada neste trabalho e representas nas figura 12 e figura 13.

Na presente pesquisa realizada, a proteína recombinante sintética foi expressa com sucesso em células de inseto Tn5B utilizando o método de expressão Bac-to-Bac. A proteína foi detectada e confirmada através da técnica de “western blot” e visualizada por eletroforese em gel de SDS-PAGE. A mesma estava aderida à um promotor viral polh.

Foi possível determinar também o tempo de infecção do vírus (através dos efeitos citopáticos presentes nas células Tn5B infectadas), que atinge seu pico no tempo de 48 horas pós inoculação, confirmado por estudos feitos por Pinto (2015), que descreve o auge da replicação do ZIKV no tempo de 48/72 horas pós inoculação.

Já se é manifesto o uso de genes responsáveis por proteínas estruturais e infectatntes, de vírus pertencentes ao gênero Flavivírus, para expressão correta, utilizando-se o sistema Bac-to-Bac. Um exemplo disto é demonstrado através de um estudo feito por Domingues (2013), que propôs o desenvolvimento de um teste sorológico capaz de detectar anticorpos anti-NS1 de Dengue vírus.

Toda via, nenhum dos trabalhos publicados utilizou da mesma estratégia de construção de proteína recombinante com multiepítpos para ZIKV, como desenvolvida nesse trabalho.

Dados não mostrados nesse trabalho, pois ainda se encontram em andamento, demonstraram uma boa eficiência do método de diagnose ELISA, não apresentando reatividade cruzada, porém com um sinal de background ainda não promissor. O mesmo ainda passará por testes, pelas instituições já mencionas e adaptações, caso necessário. De acordo com os resultados apresentados, foi possível construir uma estratégia

conveniente para a detecção do ZIKV, que direciona o desenvolvimento de um método de diagnose ELISA INDIRETO, pois neste método ocorre a sensibilização dos poços presentes na placa com uma proteína de interesse afim de se realizar a interação antígeno-anticorpo dos soros analisado, assim como, assistir-se como base para futuros estudos que visam a melhoria sobre o conhecimento da doença e saúde pública em geral.

5. CONCLUSÃO

O aumento de infecções pelo Zika vírus e as subsequentes sequelas irreversíveis, causada pelo mesmo, concebeu a necessidade de desenvolvimento de estudos que apresentassem técnicas de diagnóstico versáteis, rápidas e com um alto grau de especificidade. Este trabalho diligenciou uma nova possibilidade de diagnose, através da construção e expressão de uma proteína recombinante fusionada ao Baculovírus, denominado Multiepítipo do ZIKV capaz de apresentar reatividade e detecção de anticorpos em soro.

Devido à exemplos com a mesma estratégia, já estabelecidos no mercado a proteína desenvolvida neste trabalho encontra-se em fase teste através do estabelecimento de um teste imunodiagnóstico do tipo Elisa indireto, pelos parceiros Sabin, Fundação Oswaldo Cruz e LACEN-DF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, M. K. **Construção e caracterização cinética e fisiológica de um sistema células sf9/Baculovírus recombinante para a produção de canacistaina.** 2007. 123 f. Dissertação (Pós-graduação) em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

ARDISSON ARAÚJO, D. M. P., **Baculovírus recombinantes expressando toxina inseticida de aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante infecção in vitro.** 2012. 152f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

BARROS, M. C. E. S. **Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão.** 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Pós-Graduação em Patologia molecular da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2007.

BARROWS, N.J. et al. A Screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. **Cell Host Microbe**, United States, v. 20, n. 2, p. 259–270, Jul. 2016.

BOSCH, I. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 9, n. 409, p. 1-13, Sep. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 15, 2017**. Brasília: MS, Maio 2017.

BUATHONG, R. et al. Detection of Zika virus infection in Thailand, 2012-2014. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Toronto, v. 93, n. 2, p. 380–383, Aug. 2015.

CALVET, G., AGUIAR, R.S. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infectious Diseases**, Brasil, v. 16, n. 6, p. 653–660, Jun, 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, French Polynesia, v. 20, n. 6, p. 1085 e 1086, Jun, 2014.

CDC. Centro de controle e prevenção de doenças. Março. 2017. **Zika vírus, Transmissão e Riscos**. Disponível: <
<https://portugues.cdc.gov/zika/transmission/index.html>>

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host Microbe**, United States, v. 19, n. 5, p. 696–704, May. 2016.

DICK, G.W., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Kingstown, v. 46, n. 5, p. 509 e 520, Sep, 1952.

DOMINGUES, R. A. S. **Desenvolvimento de um teste sorológico capaz de detectar anticorpos anti-NS1 de Dengue vírus**. 2013. 111f. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Pós-Graduação em Patologia molecular da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2013.

ELLISON, D.W., et al. Complete genome sequences of zika virus strains isolated from the blood of patients in Thailand in 2014 and the Philippines in 2012. **Genome Announc**, Thailand, v. 4, n.3, p. 359-416, May. 2016.

HITCHMAN, R. B. et al. Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 107, p. 49-58, July, 2011.

INCEOGLU, A. B. et al. Recombinant baculoviruses for insect control. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 57, n. 10, p. 981-987, Oct. 2001.

INVITROGEN. **Bac-to-Bac Baculovirus Expression System: An efficient site-specific transposition system to generate Baculovirus for high-level expression of recombinant proteins**. Life Technologies, Carlsbad, 78 p. ago. 2015.

JOUANNIC, J.M., et al. Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**, French Polynesia, v. 387, n. 10023, p. 1051–1052, Mar, 2016.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 567– 575, May, 2005

MACNAMARA, F.N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Kingstown, v. 48, n. 2, p. 139 e 145, Mar, 1954.

MANSFIELD, K. L. et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **Journal of General Virology**, United Kingdom, v.92, n. 12 Sep, 2011.

MANSUY, J.M., et al. Zika virus in semen of a patient returning from a non-epidemic area. **Lancet Infectious Diseases**, Tolouse, v. 16, n. 8, p. 894–895, Aug, 2016

MARCHETTE, N.J., GARCIA, R., RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Malaysia, v. 18, n. 3, p. 411 e 415, May, 1969.

MARTINES, R.B., et al. 2016. Notes from the field: evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses e Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Brazil, v. 65, n. 6, p. 159 e 160, Feb, 2016.

MYSOREKAR, I.U. and DIAMOND, M.S. 2016. Modeling zika virus infection in pregnancy. **New England Journal Medicine**, England, v. 375, p. 481–484, Aug, 2016.

PINTO V. L. J. et al. Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, Portugal, v. 25, n. 6, p. 760-765, Dec. 2015.

REIS, C. et al. **Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica**. BNDS Setorial, Rio de Janeiro, n.29, p. 359-392, Mar. 2009.

RIBEIRO. B. et al. **Biotecnologia aplicada à saúde, fundamentos e aplicações**. 1. ed. São Paulo: Blucher, v. 3, 2016. p. 256-293.

ROHRMANN, G. F. Baculovirus molecular biology. 2nd ed. Bethesda: National Library of Medicine, **National Center for Biotechnology Information**, 2011.

ROUVINSKI, A. et al. (2015). Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. **Nature**, United King, v. 520, n. 7545, p. 109–113, Apr. 2015.

SHRESTHA, B. et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. 1-18, Apr. 2010.

SIROHI, D. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, West Lafayette, v. 352, n. 6284, p. 467–470. Mar, 2016.

SMRATI BAJPAI, M.Y.N. Zika virus infection, the recent menace of the aedes mosquito. **Journal Association Physicians India**, Mumbai, v. 64, n. 3, p. 42–45, Mar, 2016.

ZHENG, Z. et al. Highly Efficient and Economical Baculovirus Expression System for Preparing Human Papillomavirus Type16 Virus-like Particle. **Acta Biochimica and Biophysica Sinica**, Shanghai, v. 36, n. 8, p. 548-552, Aug. 2004.

YOCKEY, L.J., et al. Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, New Haven, v. 166, n. 5, p. 1247-1256, Aug, 2016.

YU-CHEN, HU. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, Shanghai, v. 26, n. 4, p. 405–416, Apr, 2005.